

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-327598

(43)Date of publication of application : 17.11.1992

(51)Int.Cl. C07K 13/00
 C12N 15/12
 // C12P 21/02
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)

(21)Application number : 03-095285

(71)Applicant : SHIONOGI & CO LTD

(22)Date of filing : 25.04.1991

(72)Inventor : IMURA HIROO
 NAKAO ICHIKAZU
 NAGATA KIYOSHI

(54) HUMAN C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel peptide useful as an agent for the detection and determination of rat C-type natriuretic peptide(CNP) and various reagents, etc., from a human genom DNA library by using the DNA sequence of the CNP as a probe.

CONSTITUTION: A human genom DNA library prepared by using a bacteriophage vector is screened by plaque hybridization using a DNA fragment of a rat C-type natriuretic peptide (rat CNP) as a probe to select a positive clone and separating the DNA from the clone by conventional process. The DNA is treated with restriction enzyme and linked with a manifestation vector to prepare a recombinant DNA containing a DNA coding a human C-type natriuretic peptide (human CNP). The recombinant DNA is introduced into E.coli and the obtained transformant is cultured to obtain a human CNP having the amino acid sequence from the 74th aspartic acid to the 126th cysteine of the sequence of formula.

Val Ala Asp Ser Thr Leu Ser Met Val Ala Asp Thr Ser
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-327598

(43) 公開日 平成4年(1992)11月17日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		7731-4H		
C 1 2 N 15/12	Z N A			
// C 1 2 P 21/02		8214-4B		
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平3-95285	(71) 出願人	000001928 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(22) 出願日	平成3年(1991)4月25日	(72) 発明者	井村 裕夫 京都府京都市左京区一乗寺北大丸町58-2
		(72) 発明者	中尾 一和 京都府京都市西京区大枝北斎町4-1-2
		(72) 発明者	永田 清 兵庫県神戸市垂水区小庫山6-10-18
		(74) 代理人	弁理士 山本 秀策 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ヒトC型ナトリウム利尿ペプチド

(57) 【要約】

【構成】 ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が提供される。上記DNA配列は、ヒトゲノムDNAライブラリーから、ラットCNPのDNA配列をプローブとして使用して得られた。

【効果】 ヒトCNPもしくはそのDNA配列を利用して、検体中のCNPの検出、測定がなされ、あるいはCNPを含む各種試薬などが調製され得る。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシステインまでのアミノ酸配列を有するヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項2】 配列番号1の1位のメチオニンから126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のヒトナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項4】 配列番号1の622位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項5】 配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項6】 配列番号2の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするヒトゲノム由来のDNA配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近ブタの脳から新規なナトリウム利尿ペプチドが単離された。この新規なペプチド群はC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)と呼ばれる。ブタCNPには、1個の分子内ジスルフィド架橋(アミノ酸17残基でなる環状構造を形成する)を含み22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP)と、該CNPのN末端が延長されて合計で53個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP-53)とがある。上記CNPの環状部分は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)および脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)と高い相同性を有する。CNPはANPおよびBNPと同様に、心臓血管動脈の平衡の調節に関与すると考えられるが、培養された血管平滑細胞中でナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーであるサイクリックGMPの産生をより高めることから、ANPおよびBNPとは異なる機能を有することが示唆される。

【0003】 Tawaragi (Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 172, No. 2, 1990) は、上記CNP-53のN末端配列およびC末端をもとにPCR反応を利用して、ブ

2

タCNPをコードするゲノムDNAおよびcDNAを単離している。これらのDNAの解析から126個のアミノ酸でなるプレプロCNPの存在が明らかにされている。FEBS LETTERS, Vol. 276, 209-213 (1990) では、ラット脳cDNAライブラリーを用いて、ブタCNP-53のN末端配列をもとにPCR反応を行い、ラットCNPのDNA配列が明らかにされている。このDNA配列からラットCNPにおいても22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ラットCNP)、53個のアミノ酸を有するペプチド(ラットCNP-53)、および126個のアミノ酸残基を有するペプチドの存在が明らかとなった。ブタCNPおよびラットCNPのコード領域のDNA配列を配列表の配列番号3および4にそれぞれ示す。これらの配列の比較から明らかなように、コード領域は約90%の相同性を有し、対応するアミノ酸配列については、それぞれのCNP-22は完全に一致することがわかる。

【0004】 上記のように、ブタおよびラットのCNPについてのいくつかの情報が明らかにされているが、ヒトについてはこのようなCNPの存在およびDNA配列についての知見は得られていない。ヒトCNPの存在もしくはDNA配列が明らかになれば、これを各種試薬、薬剤などに利用し得ると考えられる。

【0005】

【発明の目的】 本発明の目的は、ヒト由来のC型ナトリウム利尿ペプチド(ヒトCNP)のDNA配列を明らかにすることである。

【0006】

【発明の構成】 発明者らはヒトゲノムDNAライブラリーをラットCNPのcDNA断片を用いたスクリーニングに供し、ヒト由来のCNPのDNA断片を得て、その配列の決定を行うことにより、本発明を完成するに至った。

【0007】 本発明のヒトCNPは配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する。

【0008】 本発明のヒトCNPはまた、配列番号1の1位のメチオニンから126位のシステインまでのアミノ酸配列を有する。

【0009】 本発明のDNA配列は、上記ヒトCNPをコードする。

【0010】 本発明のDNA配列は、配列番号1の622位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0011】 本発明のDNA配列はまた、配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0012】 本発明のDNA配列はまた、配列番号2の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

3

【0013】本発明のヒトCNPのDNA配列の同定、およびヒト脳におけるCNP様活性の検出を以下に示す。

【0014】(1) ラットCNPをコードするcDNA断片の調製

ラットの脳から細胞の全RNAを常法により抽出する。次いで既知のラットCNPのDNA配列(FIBS LETTERS, 前出)のコード領域の5'末端付近の配列を含む断片(プライマー)および3'末端付近の配列に相補的な配列を含む断片(アンチセンスプライマー)を合成する。プライマーおよびアンチセンスプライマーのDNA配列を配列番号5および6にそれぞれ示す。これらのプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR反応を行う。得られたPCR産物を適当な制限酵素で切断し、ラットCNPのcDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378個の塩基対を有するDNA断片を得る。所望のDNA断片が得られたことは配列分析により確認される。

【0015】(2) ヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNAの配列決定

(1)項で得られたラットcDNA断片をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、約15kbの遺伝子断片(λHCNP14)を得る。この断片をBamHIおよびSmaIで消化することにより得られる断片(約3.0kb)をサブクローニングし、ジデオキシ法により配列の決定を行う。このようにして得られた2917bpのDNA配列および推定されるヒトCNPのアミノ酸配列を配列番号2に示す。イントロンと推定される部分を除くヒトCNPのcDNAの配列を配列番号1に示す。

【0016】(3) ヒトCNPのDNA配列の解析
配列番号2に記載のように、ヒトCNPのDNA配列は、少なくとも2個のエキソンと1個のイントロンとを有すると考えられる。イントロンは400番目のGから843番目のGまでであると考えられる。このイントロンの位置は、このゲノムDNAの配列とラットCNPのcDNA配列とを比較することにより決定された。エキソンとイントロンとの境界には、スプライシングドナー(AAG/GTGGGT; 397~405番目の塩基)およびスプライシングアクセプター(CAG/G; 841~844番目の塩基)が存在する。RNAポリメラーゼIIの結合に関与しているTATAAA配列(TATAボックス)は134~139番目の塩基の位置にある。さらに、逆向きのCCAAATボックス(Yボックスのコア配列)、2個のGCボックス、およびサイクリックAMP応答要素(CRE)様配列が、5'隣接領域に存在する。このようなCCAAATボックスおよびサイクリックAMP応答要素様配列は、ANPおよびBNPの上流配列には存在しない。CNPの開始コドン(ATG)は

4

310~312位に存在する。第1のエキソンは、5'非翻訳領域、シグナルペプチド(最初の疎水性アミノ酸23個)をコードするDNA配列、および成熟ペプチドの最初のアミノ酸7個をコードするDNA配列を有する。第2のエキソンは、CNPの成熟ペプチドの8番目のアミノ酸であるバリンをコードするGTCから終止コドンであるTAGまでのDNA配列を含み、さらに、3'非翻訳領域を含む。このDNA配列においては、3'非翻訳領域に、典型的なポリアデニル化シグナル(AATAAA)が翻訳終止コドンの約1900bp下流までの領域には見出されなかった。このことにより、ヒトCNP遺伝子は長い3'非翻訳領域を有すること、および/または3'非翻訳領域に第2のイントロンが存在することが示唆される。ちなみに、ANPおよびCNPについては、3個のエキソンと2個のイントロンとを有し、第3のエキソンはC末端延長コード領域(CNPには存在しない)を有する。

【0017】上記遺伝子構造から、ヒトCNPとしては配列番号1に示すように、1番目のアミノ酸であるMetから126番目のCysまでの126アミノ酸でなるプレプロ型のCNP、74番目のAspから126番目のCysまでの53アミノ酸でなるCNP(ヒトCNP-53)、および105番目のGlyから126番目のCysまでの22アミノ酸でなるCNP(ヒトCNP)が存在することがわかる。上記CNP-126の最初の23アミノ酸残基は疎水性に富むことからシグナルペプチドであると考えられる。23番目のAlaと24番目のLysとの間で開裂が起こりプロCNPが生じると考えられる。

【0018】上記3種のアミノ酸配列を、配列番号3に記載のブタCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列、および配列番号4に記載のラットCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列とそれぞれ比較すると、CNPについては、そのアミノ酸配列がすべて同一であることがわかる。CNP-53については、ヒトとラットとで2個、そしてヒトとブタとでも2個のアミノ酸の相違がある。プレプロCNPについては、ヒトとラットとで8個、そしてヒトとブタとでは5個のアミノ酸の相違がある。それぞれのDNA配列(開始コドンからTAGまで)を比較するとヒトとラットとでは94%(CNP)、94%(CNP-53)および89%(プレプロCNP)の相同性があり、ヒトとブタとでは95%(CNP)、95%(CNP-53)、および93%(プレプロCNP)の相同性がある。特に、5'隣接領域、およびシスエレメントの配列がヒトおよびブタCNPにおいてよく保存されており、CNPのDNA配列は、ナトリウム利尿ペプチド群のなかで最も保存性が高いことがわかる。

【0019】(4) CNP様活性の検出方法
ヒトCNP様活性は、上記DNA配列に基づいてCNP

ペプチドを合成し、これを用いて得られる抗血清を用いた免疫反応により検出され得る。例えば、CNPあるいは【Tyr⁶】-CNP (CNPのN末端にTyrが結合したペプチド) を固相法により化学合成し、これをマウスに投与して得られる抗血清を用いてラジオイムノアッセイ (RIA) を行うことにより検出される。RIAは、ANPを検出するためのRIAの方法 (J. Clin. Invest., 81:1962-1970) に準じて行われ得る。上記方法によるCNP様活性において、最小検出限界は2.0 fmol/チューブであった。CNP様活性のα-ヒトANPおよびヒトBNPに対する交叉反応性は、それぞれ0.2%および0.01%未満であった。50%結合阻止濃度 (CNP抗体と標識CNPとの結合が50%阻止されるCNPの濃度) は30 fmol/チューブであり、変動係数は、同じ系で同日に続けてこの実験を9回行った場合が8.7%、そして同じ系を作成して別々の日に8回にわたり行ったところ9.1%であった。

【0020】同様に、ヒトANPについてのRIAにおいて、ヒトBNPおよびCNPとの交叉反応性はそれぞれ0.01%未満であり、BNPについてのRIA (J. Clin. Invest., 印刷中) において、ヒトα-ANPおよびCNPとの交叉反応性は、それぞれ0.01%未満および1%未満であった。

【0021】(5) ヒト脳におけるCNP様活性の検出
ヒトの脳の抽出物を逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、各フラクションについて、CNP様活性を、上記(4)項のRIAの方法により調べた。図1に得られたCNP様活性を示す。CNPを化学合成し、同一条件でHPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出されたため、これがCNPに相当するピークであると考えられる。6.6分に溶出されたフラクションのピークは、既知のプタCNPとの比較からCNP-53であると考えられる。図1における破線はCNPの検出限界を示す。

【0022】次にヒトの脳の異なる領域からの抽出物のそれぞれについて、上記(4)項のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

脳の部位	CNP様活性	ANP様活性	BNP様活性
大脳皮質	0.81	< 0.07	< 0.06
視床	2.90	< 0.07	< 0.06
視床下部	4.02	0.13	< 0.06
中脳	3.78	< 0.07	< 0.06
延髄	< 0.4	0.18	< 0.06
小脳	2.78	0.08	< 0.06
小脳 (皮質)	< 0.85	0.07	< 0.06

(単位: pmol/g組織湿重量)

【0024】表1から、ヒト脳内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1桁高く、このことからCNPは主として脳内で生じる主要な

ナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、視床下部、中脳、視床および延髄において高いレベルであることがわかる。これに対して、ヒトの心臓およびプラズマからは高レベルのCNP様活性が検出されない。従って、CNPは、BNPがヒトおよびラットの心室から分泌されるのとは全く異なる組織特異的発現性を有することがわかる。

【0025】上記のように、CNPのDNA配列は、ANPおよびBNPのDNA配列には存在しないCCAA TボックスおよびサイクリックAMP応答要素様配列を有する。このことはCNPの発現の制御機構がANPおよびBNPのそれとは異なっていることを示唆する。最近、Andersonらにより、2個並んだCRE配列と、CCAATボックスと、その間の連結調節要素とよばれる配列 (シスエレメント) とが、糖タンパクα-サブリット遺伝子の組織特異的発現を増大させることが報告された (J. Biol. Chem. 265:21876-21880)。発明者らは、CNP様活性は、ラット脳下垂体の前葉に最も多く存在することを実験により確かめており、このデータをあわせて考えると、上記シスエレメントは、CNP遺伝子の組織特異的な発現性を付与すると考えられる。

【0026】

【実施例】以下に本発明を実施例につき説明する。

【0027】(実施例1)

(1) ラットCNPをコードするcDNA断片の調製
ラットの脳から細胞の全RNAを4Mグアニジンチオシアネートバッファーを用いて抽出した。次に、下記のセンスプライマーAおよびアンチセンスプライマーB (配列番号5および6に示される) を化学合成した。

【0028】センスプライマーA

ATATGAGCTCATGCACCTCTCCAGCTGATC

アンチセンスプライマーB

TACGCTCCACTAACATCCAGACCCCTCAT

プライマーAは、既知のラットCNPのDNA配列 (FEBS LETTERS, 前出) のコード領域の5'末端付近の配列であり、プライマーBは3'末端付近の配列に相補的な配列であり、それぞれS_{acc}IおよびS_{al}Iで制限部位が付加されている (下線部)。モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) を用いて、オリゴ (dT) プライミングによって、5μgの全RNAの逆転写を行った後、得られた一本鎖のcDNAを標準的な条件下でPCR反応に供した。増幅後、そのPCR産物をS_{acc}IとS_{al}Iとで消化して、調製用の1.0%アガロースゲル電気泳動により分離した。その分離されたDNA断片を、増幅のためにpUC119またはBlue script (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングした。このようにして、ラットCNP cDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378bp

の断片が得られた。このことは上記配列を分析することにより確認された。

【0029】(2) ヒトゲノムライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNA配列の決定
ヒトゲノムDNAライブラリー (Clontech Inc., Mountain View, CA) を、ハイブリダイゼーション用プローブとしてPCRで増幅された上記ラットCNP cDNA断片を用いて次のようにスクリーニングした。

【0030】まず、バクテリオファージ入EMBL-3ベクターを用いて作成された上記ヒトゲノムDNAライブラリーを、*E. coli* LE392株に導入した。これをColony/Plaque Screenフィルター (Du Pont, Boston, MA) へ、二本鎖の状態で移した。フィルターと結合したDNAを変性させ、UV照射によって固定した (Stratilinker, Stratagene, La Jolla, CA)。そのフィルターを、50mMトリス塩酸 (pH7.5)、1M NaCl、10%デキストラン硫酸、1% SDS、200μg/ml 酵母tRNA および200μg/ml 剪断された精子DNA含有の溶液中で60℃においてプレハイブリダイズした。次に、上記プレハイブリダイゼーション溶液に³²P標識した上記ラットCNP cDNAプローブを加え、この容器を用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、そのフィルターを0.5xSSC (1xSSCは0.16MNaCl、0.016Mクエン酸ナトリウム)、0.1% SDSにより、45℃で3回洗浄した。スクリーニングの2段階目において、フィルターを更に厳しい条件のもとで洗浄した (0.2xSSC+0.1%SDSにより、50℃ 3回)。

【0031】約1×10⁶個のクローンをスクリーニングし、9個の陽性のクローンを得た。このクローンは、ヒトANP cDNAプローブおよびヒトBNP cDNAプローブ (J. Clin. Invest. 印刷中; およびJ. Clin. Invest. 83:298-305) と交叉ハイブリダイゼーションを行わなかった。1つのクローン (λHCNP141) 由来で約15kbのヒトCNP遺伝子断片を有するDNAおよび該DNAの約3.0kbのBamHI-SalI消化断片をさらに次のように分析し、配列を決めた。

【0032】上記DNA断片をBluescriptまたはpUC119ベクターへサブクローニングし、ジデオキシ鎖停止法によってDNAの配列決定を行った。二本鎖DNAの両方の鎖を解読することにより上記DNA配列の正しいことが確認された。

【0033】(3) CNP様活性の検出

ヒトの脳および他の臓器は相補的合併症を併わない死体の解剖によって得た。得られた脳およびその他の臓器をただちに液体窒素で凍結し、使用時まで-70℃で保存した。上記臓器からの抽出物を下記の条件により逆相高速液体クロマトグラフィーにかけた。上記HPLCはN

ucleosil 5C₁₈カラム (4.6×150mm, Macherey-Nagel, Duren, Germany) を用い、0.1%トリフルオロ酢酸中でアセトニトリルを20~40%に増加させるリニアグラジエント法で行った。各フラクションについて、「発明の構成」の項で述べた標識CNP抗体を用いたRIAによりアッセイを行い、CNP様活性の測定を行った。その結果を図1に示す。CNPを化学合成し、同一条件でHPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出された。従って、この位置に現れるピークがCNPであると考えられる。保持時間6.6分で溶出されたフラクションのピークは、既知のブタCNPとの比較からCNP-53であると考えられる。図1における破線は、CNPの検出限界を示す。

【0034】次にヒトの脳の異なる領域からの抽出物のそれぞれについて上記と同様のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果、「発明の構成」の項の表1に示す活性が測定された。この表からヒト脳内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1桁高く、このことからCNPは主として脳内で生じる主要なナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、視床下部、中脳、視床および延髄に高いレベルであることがわかる。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、このように、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が得られる。これらを用いて検体中のCNPの検出、測定、あるいはCNPを用いた各種試薬、薬剤などが調製可能となる。

【0036】

【配列表】

【0037】

【配列番号:1】配列の長さ:2473

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to genomic DNA

起源:ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号:CAAT signal

存在位置:81..86

特徴を決定した方法:5

特徴を表す記号:GC signal

存在位置:89..94、および101..106

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: TATA signal

存在位置: 134..139

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 310..690

特徴を決定した方法: S

配列

GGATCCTCC GGGGTGGGAT AAGGAGGGG AGCCCTCCG GCGCCCTCC GCGCCTCGG 60
 GCGCCCGGT GCGTGGTGC ATTGGCCCG GCGCCCGGT GCGCGGAGG ATGACATCAG 120
 GCGCAGGTTG GATTATAAG GCGCGAGCAG AETCAGGGC TCAGAGGCA CCCAGCUGG 180
 GCGCCGAGC ACTGGGAGC TGCTGGGCT GCAGCCAGC CAGCCTGCTC GCGATCCCC 240
 TGCTGGTCTC CCGGCGAGC TGCGCGGCT CGCTGGGCTC GGTGTGCGC CTTGAGGCG 300
 AGCGCAGC ATG CAT CTC TCC CAG CTG CTG GCC TGC GCC CTG CTG CTC 348
 Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu
 1 5 10
 AAG CTG CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GAG GCG CCG CCG 386
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser Gln Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro
 15 20 25
 AAG GTC CCG CGA ACC CCG CCG GCA GAG GAG CTG GCC GAG CCG CAG GCT 444
 Lys Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala Gln Gln Leu Ala Gln Pro Gln Ala
 30 35 40 45
 GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC GAC AAG GCT CCC GGG GGC GGC GGC 492
 Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 GCU AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG CGA CTG CTC CGG GAC CTG CCG GTG 540
 Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val
 65 70 75
 GAC ACC AAG TCC CGG GCA GCG TGG GGT CGC CTT CTG CAA GAG CAC CCC 588
 Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Gln His Pro
 80 85 90
 AAC GCG GCG AAA TAC AAA GGA GGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAG GGC 636
 Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly
 95 100 105
 TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA ATC GGC TCC ATG ACC GGC CTG GGA 684
 Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 110 115 120 125
 TGT TAGTGGGCG CCCTGGGCG GCGGTAGTA CGGCCACCT GAGGCCAGC 732
 Cys
 126
 CCGAGCTGG CCGGGAGCG CCGGCGGC AGCGGCTTC GGAGGCGCG GAGCGGCTT 792
 TGCTCAAGT GTGCTAGCG TTGCGAGCC GCGCCCTTA TTATCCACT TTACAGACAA 852
 AGAAGCGAA GATAAGCTG ATCGGGGAA TTTGCAAGG TCAGAAAGG CTCAGCTGG 912
 TTGAAGCAC CTGGCTTCT CTGAGAGAG AGAAGAGG TTGCTGCTT CTCACCTACC 972
 CCGAAGCGT AGCTGAAGT GAGCACTGG CCGCTATTG CAGCTGGTG GCGGATTGA 1032
 GAGGAGATCA TGGGTTTGT GAGCAGAGA AGGAAGGTA CAGCCACAG TCAGGGGAC 1092
 ATCGATCAT TCTGCGCAC CATGCCCCC GTAGTGAGG TAGCCCTCTG CTGCACTGT 1152
 CAGGCGGCT TCTGCTGGG AACTCCGAT TCTGTCCTT TCTTAAGC CAGGCACTG 1212
 GCAAACTGG CTGTCCAGG TCTGAGGCA GCTGAGGCT GGTTGCTTG GCGGTGAATC 1272
 TCAGTCTTG TGGCACTAT TCAGGAATA GGAAGAGCA TAAAGTAAAT ATTATTGCC 1332
 CCAGCCTCA ACTCAACAG TCCAGAGTC CCTCACCAC CTGTCCCGA CCAACCGGT 1392
 GCTGTGGGT CCGTTTCTG TGTTGGGCT CACCTGAC TAGGCTGGA AACCTCTGC 1452
 CTAGCGCAC CCGTCCCGG TGCGCGTGG TGCTAATTA CTGCTGAGA GAGCCTCAG 1512
 TCTGCTTCT CCGTCTCTC TATTCCTGC GCTGCGCGT GCGCACTGA TACATCCA 1572

11 12

GCCTGTGACA TTGACASTUA TGTGCGTTAG GATCAGGCTT ACCTGGCTTT CTGCTTTCT 1637
 TGCTTCAGC TCAGCAGCTG CCACTGCTG TCCACACCT TGACTGTCC ATCCAGGCT 1697
 ACGGGCAAGC TGCTGTCTCC TCCCAGAAA CCTTGTCTAG TGTGGGATCT TCTCCGGAG 1757
 GAAACAAGAG CGCTGTGCA GCACACTGT TCTTTTTAC AGTACAGAAC ACTTTTTAC 1817
 AGTTTGTGA CCAATTGACC TCTCATATT GAACAGCTTA AGGGCGAAGT GCTGGCTAA 1877
 GGAATCTAG GACCCACTGC ACCTCGAACA GACTGTGGA AATATTTGT AATGACCAGA 1937
 GAAACAGCA CACCTGGGC CATGGCACT CCACCTGCC GAGGTTTTAA CCAAGGCTT 1997
 TCTCTCTTT GAGGAGAGC CTCACCTGG TGTGGGCTC TCCGAGTTC TGCAGAGCT 2057
 GTAGTTGTCT GTGATCTGA CTCTCCCTG CACAGGAGA AGAATGATC TGACACTGG 2117
 GCAACAGCT TCAGTAGCTA CTTTGAAT GCCTTTGCT TCTCTCTCT TGTCTAAACA 2177
 ACAAGAGAC GGAGTCTGAG GCTCAAAAT TTCAGTTGA TTTAAGCAT AAGTCAAAC 2237
 ITTAGAACCT GAGCAATGT TAGTGACTCT CATTGGTTC GTACCTGGAA TGGCATCTA 2297
 CAGGGGCTTT GTTGTGGG CTGATGTCT GTGCTACCA AGTATGGGC AAACGGTGG 2357
 TGAAGATGC TGTGTAGGAG GAATCCACAT TGTTAAGAAT TCTGAGCCC TTTGATCAGG 2417
 GGGTTCAAT AATCTCTAC CAGCTCTCT AGCATAGAT AACACTTACC GTGAC 2473

【0038】

【配列番号：3】配列の長さ：3917

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CAAT signal

存在位置：81..85

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：GC signal

存在位置：89..94、および101..106

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：TATA signal

20 存在位置：134..139

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：CDS

存在位置：310..399、および844..1134

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：intron

存在位置：400..843

特徴を決定した方法：S

配列

CGATCTCTC GGGGTGGAT AAGGAGGGG AGCCCTTCC GCGGCTTCC GCGGCTGCG 60
 GCGGCTGCG GCGGCTGCG ATGCGCGCG GCGGCTGCG GCGGCTGCG ATGACATCG 120
 GCGGCTGCG GATTATAAG GCGGAGGAG AGTCAAGGC TCAGAGGCA CCCAGCTGG 180
 GCGGCTGCG ACTGGGAGC TCGTGGGCT GCGGCTGCG CAGGCTGCT CCGATCGCC 240
 TCGTGGGCT CCGGCTGCG TCGGCTGCG GCGGCTGCG GCGGCTGCG CCGATCGCC 300
 AGCGGAGC ATG CAT CTC TCC CAG CTG CTG GCG TGC GCG CTG CTG CTC 348
 Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu
 1 5 10
 ACG CTG CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GCC AAG CCC GGG CGG CCG CGG 396
 Thr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro
 15 20 25
 AAG GTGGGTGCTG TCTGGGAGC GCGGAGCTG GAGAGGCGT GCGGAGCTG 449
 Lys
 30
 GCGGCTGCG AATCGGCGC GCAAGACCA GAGAGAGGG AAGGAGGCG GCTGTCTCT 509
 CCGAGATGG GGTGGGCGAG AGCCGCGGAG CCTTGAAGC GCGGATTCG GCGTCCACT 569
 CTCTAGCTC GCGGAGCAT CCGGCTGCG GCGGCTGCG ACCCGAGCT GCGTGGCTG 629
 GCGGAGCA AAGGAGGCG AGGGGCTTC GCGGAGGAG GCGGAGGCG GCGGCTGCG 689
 AGGTGATGC GCGGCAAGC TCGGCGCAT GCGGCGGCG GCGTGTGCG TTGGAGGGA 749
 CACCCCGCG GCGGAGGCG GTGGGCTG AGCATCAGG TCGGCTGCG TCGAGCGCG 809
 TGTCTCTTA CCGGCGCTT CTTCTCTCG ACAG GTC CCG CGA ACC CCG CCG GCA 869
 Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala

13	14
	35
GAG GAG CTG GGC GAG CCG CAG GCT GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC	912
Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly	
40 45 50	
GAC AAG GCT CCC GGG GGC GGG GGC GCC AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG	960
Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser	
55 60 65	
CGA CTG CTC CGG GAC CTG GCG GTG GAC ACC AAG TCG CGG GCA GCG TGG	1008
Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp	
70 75 80 85	
GCT GCG CTT CTG CAA GAG CAC CCC AAC GCG CGC AAA TAC AAA GGA GGC	1056
Ala Arg Leu Leu Glu Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala	
90 95 100	
AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAG GGU TGC TTC GGU CTC AAG CTG GAC CGA	1104
Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg	
105 110 115	
ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAGTGGGGC CCCCTGGCG	1151
Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys	
120 125 126	
GGGTTAGTA CGGCCACCC GACGCUAGC CCCAGCCCGG CCGGGACCG CCCGCGGCC	1211
AGCCGCTTC GGAGGGCGCC GAGCCGCTT TCCTCAAGTT GTGCTAGCG TTGCGAGCC	1271
GGCCCTTTTA TTATCCCACT TTACAGACAA AGAAGCGAA GGATAACGTG ATGGGGGAAC	1331
TTTGGCAAGG TCAGAAACGG CTCAGCCTGG TTGAACCCAC CTGGCTTCTT CTGGAGAAGC	1391
AGAAACAGCG TTGGTGGTGT CTCACCCACC CCGTAACCGT AGCTGAACCTA GCAGCACTGG	1451
CCCTATTGG CCAGCTGCTG GGGGATTGA GAGGAGATCA TCGTTTGTG GGAGCAGAGA	1511
AGGAAGCTTA CACCCACAAG TCCAGGGGAC ATCGATCATC TGCTGGCCAC CATGCCCTCT	1571
GTAGTGAGAG TAGCCCTCTG CTGGCACTGT CAGCGGCCCT TCTGCTGGG AACTCCGAT	1631
TCTGTCCCT TCTCTAAAC CAGGCACTGG GCAAACTGGT CTGTCCAGGG TCCTGAGGCA	1691
GTGTCAGCT GGTGCTTTC GGGTGAATC TCAGTCTTG TGGCACTATT TCAGCGAATA	1751
GGAAAGACAC TAAAGTAAAT ATTATTGCC CCAGCCCTGA ACTCAACAGC TCCAGAGTC	1811
CTCACCACAC CTTGTCCGA CCCAACCGGT GCTCTGGCT CCGTTTCTGG TGTGGGTCT	1871
CACCCGACAC TAGGGCTGA AACCTCTGC CTACCGCCAC CCGTGGCGGG TGCGGCTGG	1931
TGGTAATTTA CTGCTGCAGA GAGCTCACC TCTCTCTTT CCTCTCTCT TATCTCTCC	1991
GCUTGCCCT GGCACCTGAA TAACATCCA GCUTGTGACA TTGACACTUA TGTGCGTTAG	2051
GATNGGCTT ACCTGGCTTY CTGCTTTCT TGCCTCAGC TCAGCAGCTG CCACTGCCCTG	2111
TCCACACCT TCACTGTCCC ATCCAGGCT ACGGGCAAGC TGCTGTCTCC TCCCAGAAA	2171
CCCTGTGAG TGTGGATCT TCTCCCGAG GAACAAGAG CGCTGTCCA GCACATGTC	2231
TCTTTTTAC AGTACAGAAC ACTTTTTCAC AGTTTGTGAA CCATTACCC TCTCATATT	2291
GAACAGCTTA AGGGCGAAGT GTTGGCTAA GGCATCTAG GACCCACTGC ACCCGAACA	2351
GACTGTGGA AATATTGTG AATGACCAGA GAACCCAGCA CACCTGGCC CATGGCACTC	2411
CCACTGCCC GAGTTTITAA CCAGTGGCT TCTCTCTTT GCAGCCAGAC CTCATCGGC	2471
TGTGGGCTC TCCCACTTC TCAAGGCT GTAGTGTCT GTGATCTGA CTCTCCCTG	2531
CACAGCGGA AGAATGATT TGACACTTGG GGACCACTT TCAGTAGCTA CTTTGGAAAT	2591
GGCTTTGCT TCTCTCTCC TGTCTAAACA ACAAGAGAC GGAGTCTGAG GCTCAAATT	2651
TTCACTTGA TTTAAGCAT AAGTTCAAAC TTTAGAACCT GAGCAATGT TAGTCACTCT	2711
CAATGTGTC GTACCTGGA TGCATATCA CAGGGCTTT GTTCTTGGC CTGGATGTCT	2771
GTGGTCAACA AGTATGACC AAACCGGTGG TGAAGATGC TGTGTAGGAG GAATCCACAT	2831
TGTTAAGAA TCTGACCCC TTGATCAGG GGGCTCAAT AATCTCTAC CAGCTCTCTT	2891
AGCATAGATG AACCTTACC GTCGAC	2917

15

16

【0039】

【配列番号：3】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

*起源：ブタ

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG CTG GGC TGC GCT CTG CTG CTC ACG CTC CTC	48
TGG CTC GGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GGA GCG CCG CCG AAG GTC CCT	96
CGA ACT CCG CCA GGG GAG GAG GTG GCT GAG CCC CAG GCT GGG GGC GGC	144
GCT CAG AAG AAG GGC GAC AAG ACT CCT GGG GGC GGT GGC GGC AAC CTC	192
AAG GGC GAC GGG TCT CGA CTG CTC GGG GAC CTG GCG GTG GAC ACC AAG	240
TCT GGG GCG GCG TGG GCG GCG CTT CTG CAC GAG CAC CCG AAC GCG GCG	288
AAA TAC AAA GGA GGC AAC AAG AAG GGT TTG TCC AAG GGC TGC TTC GGC	336
CTC AAA CTG GAC CCG ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAG	381

【0040】

【配列番号：4】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

※起源：ラット

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

30 存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG ATC GGC TGT GCG CTG CTG CTC GCG CTA CTC	48
TCA CTC GGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GGG ACA CCA CCG AAG GTC CCG	96
AGA ACC CCG CCA GGG GAG GAG CTG GCA GAG CCC CAG GCA GCT GGT GGC	144
AAT CAG AAA AAG GGT GAC AAG ACT CCA GGC GGC GGG GGA GGC AAT CTC	192
AAG GGA GAC CGA TGG CGA CTG CTT GGG GAC CTG GGT GTG GAC ACC AAG	240
TCC CCG GCG GCG TGG GCT CCG CTT CTG CAC GAG CAC CCG AAC GCG GCG	288
AAA TAC AAA GGC GGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAA GGC TGC TTT GGC	336
CTC AAG CTG GAC CCG ATC GGC TCC ATG AGC GGT CTG GGA TGT TAG	381

【0041】

【配列番号：5】配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATATGAGCTC ATGCACCTCT CCCAGCTGAT C	31
------------------------------------	----

【0042】

【配列番号：6】配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：合成DNA

配列

TTTCTGAC TAACATCCCA GACCGCTCAT	30
--------------------------------	----

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のCNPを用いて作成したCNP抗体を

用いたRIAにより測定したヒト脳中のCNP様活性を示すグラフである。

【図1】

